



ZytoLight

SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe

REF Z-2206-50 Σ 5 (0.05 ml)

REF Z-2206-200 Σ 20 (0.2 ml)

Per la rilevazione qualitativa delle traslocazioni che coinvolgono il gene umano NTRK3 nella regione 15q25.3 mediante ibridazione in situ fluorescente (FISH)



Dispositivo medico – diagnostico in vitro
in conformità alla Direttiva UE 98/79/EC

1. Scopo previsto

La sonda ZytoLight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe (PL164) è adibita alla rilevazione qualitativa delle traslocazioni che coinvolgono il gene umano NTRK3 nella regione 15q25.3 in campioni citologici o in campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina come cellule leucemiche mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH). La sonda va utilizzata in combinazione con il kit ZytoLight FISH Implementation Kits (codice prodotto Z-2028-5/-20, o Z-2099-20).

L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da un patologo qualificato, considerando il contesto della storia clinica del paziente rispettando gli altri dati clinici e patologici.

2. Rilevanza clinica

NTRK3 (neurotrophic receptor tyrosine kinase 3, anche noto come TRKC) è un recettore tirosinico chinasi (TK) per la neurotrofina 3 (NT3) e gioca un ruolo chiave nello sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico e nella sopravvivenza cellulare. Le traslocazioni che coinvolgono il gene NTRK3 sono state identificate in diversi tipi di tumori, compresi il glioblastoma, la leucemia linfoblastica acuta Philadelphia chromosome-like, il fibrosarcoma congenito, il nefroma mesoblastico cellulare, la leucemia mieloide acuta, il tumore della tiroide associato a radiazioni, il carcinoma secretorio della mammella e il carcinoma secretorio della ghiandola salivare, simile a quello della mammella. Il riarrangiamento più frequente che coinvolge il gene NTRK3 è il t(12;15) p13.2;q25 che comporta la fusione dell'estremità 5' del gene ETV6 con l'estremità 3' del gene NTRK3. Questo gene di fusione codifica per una proteina ibrida che comprende il dominio TK di NTRK3 e il dominio di dimerizzazione di ETV6 che porta a un'attività TK ligando-indipendente. Il trattamento di pazienti con tumori positivi alla fusione di NTRK1, 2, o 3 con un inibitore di NTRK, come ad esempio i farmaci approvati FDA larotrectinib o entrectinib è associato a un alto grado di risposta, indipendentemente dal gene NTRK, da I partner di fusione e dal tipo di tumore. Di conseguenza, la rilevazione delle traslocazioni di NTRK3 utilizzando la FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) potrebbe avere una rilevanza diagnostica e terapeutica.

3. Principio del metodo

La tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) consente la rilevazione e la visualizzazione di sequenze nucleotidiche specifiche in preparazioni cellulari. I frammenti di DNA marcati in modo fluorescente, chiamati sonde FISH, e i loro frammenti di DNA complementare nelle preparazioni sono co-denaturati e riuniti durante l'ibridazione. Successivamente, i frammenti di sonda non specifici e non legati, sono rimossi con lavaggi stringenti. Dopo la contro colorazione del DNA con DAPI, i frammenti di sonda ibridati sono visualizzati utilizzando il microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtri specifici per i fluorocromi con cui sono direttamente marcati i frammenti di sonde FISH.

4. Reagenti forniti

La ZytoLight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe è composta da:

- Polinucleotidi (~10.0 ng/ μ l), marcati con ZyGreen (eccitazione 503 nm/emissione 528 nm), le cui sequenze target mappano in 15q25.3-q26.1* (chr15:88,825,346-89,475,889) distali al punto di rottura di NTRK3 (vedere Fig. 1).
- Polinucleotidi (~4.5 ng/ μ l), marcati con ZyOrange (eccitazione 547 nm/emissione 572 nm), le cui sequenze target mappano in 15q25.3* (chr15:87,976,717-88,471,002) prossimali al punto di rottura di NTRK3 (vedere Fig. 1).

• Tampone di ibridazione a base di formammide

*conformemente all'Human Genome Assembly GRCh37/hg19

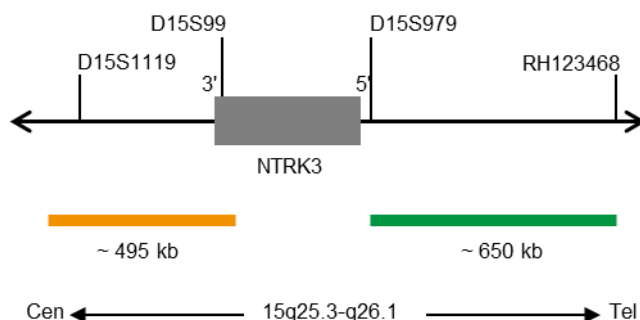


Fig. 1: SPEC NTRK3 Mappa della sonda (non in scala)

La sonda ZytoLight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probe è disponibile nei seguenti due formati:

- Z-2206-50: 0.05 ml (5 test da 10 μ l ciascuno)
- Z-2206-200: 0.2 ml (20 test da 10 μ l ciascuno)

5. Materiali richiesti ma non forniti

- Campione controllo positivo e negativo
- Ibridizzatore o piastra calda
- Ibridizzatore o camera umida in stufa di ibridazione
- Timer
- Vaschette di colorazione
- Termometro calibrato
- Pipette a volume variabile (10 μ l, 25 μ l)
- Etanolo or reagente alcolico
- Acqua deionizzata o distillata
- Vetrini coprioggetto (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Colla per vetrini, per esempio Fixogum Rubber Cement (codice prodotto E-4005-50/-125) o simili
- Microscopio a fluorescenza (400-1000x)
- Olio a immersione per fluorescenza
- Set di filtri appropriato

Campioni citologici

- ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit (codice prodotto Z-2099-20)
- Vetrini portaoggetto non rivestiti
- Bagno termostato (70°C)
- Formaldeide 37%, acid-free, o formalina 10% neutra tamponata
- 2x Saline-Sodium Citrate (SSC), per esempio dalla soluzione 20x SSC Solution (codice prodotto WB-0003-50)

Campioni FFPE

- ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (codice prodotto Z-2028-5/-20)
- Vetrini portaoggetto a carica positiva
- Bagno termostato (37°C, 98°C)
- Xilene

6. Conservazione e stoccaggio

Conservare a 2-8°C in posizione verticale e protetta dalla luce. Utilizzare proteggendo dalla luce. Riportare alle condizioni di stoccaggio indicate subito dopo l'utilizzo. Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata in etichetta. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta, se correttamente conservato.

7. Avvertenze e precauzioni

- Leggere le istruzioni prima dell'utilizzo.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Questo prodotto contiene sostanze (in bassa concentrazione e volume) che sono nocive per la salute e potenzialmente infette. Evitare qualsiasi contatto diretto con i reagenti. Prendere le adeguate misure di precauzione (utilizzare i guanti, gli occhiali di protezione e il camice da laboratorio).
- Se il reagente dovesse entrare in contatto con la pelle, risciacquare subito abbondantemente.
- La scheda di sicurezza è disponibile su richiesta per usi professionali.
- Non riutilizzare i reagenti.
- Evitare la cross-contaminazione dei campioni, in quanto questo potrebbe portare a risultati sbagliati.
- La sonda non deve essere esposta alla luce, in particolare modo a luci intense, per lunghi periodi di tempo; per esempio, tutti i passaggi dovrebbero essere svolti, se possibile, al buio o utilizzando contenitori scuri.

Fraasi di pericolo e prudenza:

Il componente pericoloso è la formamide.



Pericolo

H351	Sospettato di provocare il cancro.
H360FD	Può nuocere alla fertilità. Può nuocere al feto.
H373	Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta.
P201	Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso.
P202	Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze.
P260	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P308+P313	In caso di esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico.
P405	Conservare sotto chiave.

8. Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Solo per usi professionali.
- L'interpretazione clinica di qualsiasi colorazione positiva, o la sua assenza, deve essere condotta considerando il contesto della storia clinica, la morfologia e altri criteri istopatologici come altri test diagnostici. È di responsabilità di un patologo qualificato avere familiarità con le sonde FISH, reagenti, pannelli diagnostici e metodi usati per produrre il preparato. Le colorazioni devono essere eseguite in un laboratorio certificato e competente sotto la supervisione di un patologo che è responsabile della rivalutazione dei vetrini e che garantisce l'adeguatezza dei controlli positivi e negativi utilizzati.
- La colorazione, in particolar modo l'intensità del segnale e il rumore di fondo, dipende da come il campione è stato gestito e processato prima della colorazione stessa. Una fissazione impropria, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento, il sezionamento o la contaminazione con un altro campione o fluido può produrre artefatti o falsi risultati. Risultati incoerenti possono derivare da variazioni nei metodi di fissazione e inclusione
- La sonda dovrebbe essere usata solo per identificare i loci descritti nella sezione 4 "Reagenti forniti".
- La performance è stata validate utilizzando le procedure descritte in queste istruzioni per l'uso. Modifiche a queste procedure potrebbero alterare la performance e devono pertanto essere validate dall'utilizzatore.

9. Sostanze interferenti

I globuli rossi presenti nel campione potrebbero esibire auto fluorescenza che disturba l'identificazione dei segnali.

I seguenti fissativi non sono compatibili con la FISH:

- Fissativo di Bouin
- Fissativo B5
- Fissativi acidi (per esempio, acido picrico)
- Fissativo di Zenker
- Alcoli (quando utilizzati da soli)
- Mercurio cloruro
- Formaldeide zincata
- Fissativo di Hollande
- Formalina non tamponata

10. Preparazione dei campioni

Campioni citologici

- Preparare i campioni come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Campioni FFPE

- Fissazione in formalina 10% neutra tamponata per 24 h a temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensioni del campione ≤ 0.5 cm3.
- Utilizzare paraffina di qualità.
- L'inclusione dovrebbe essere effettuata a una temperatura inferiore ai 65°C.
- Allestire sezioni al microtomo di 2-4 µm di spessore.
- Utilizzare vetrini a carica positiva.
- Fissare per 2-16 h a 50-60°C.

11. Trattamento preparatorio del prodotto

Il prodotto è pronto all'uso. Non deve essere ricostituito, mescolato o diluito. Portare la sonda a temperatura ambiente (18-25°C) prima dell'uso, proteggere dalla luce. Prima di aprire la vial, vortexare e centrifugare brevemente.

12. Procedura di lavoro

Campioni citologici

Pretrattamento del campione

Pretrattare il campione conformemente a quanto riportato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Denaturazione e ibridazione

1. Pipettare 10 μ l di sonda su ciascun campione pretrattato.
2. Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto 22 mm x 22 mm (evitare la formazione di bolle) e sigillare il coprioggetto.

Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).

3. Porre i vetrini su piastra calda o su ibridizzatore e denaturare i campioni per 5 min. a 72°C.
4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

È fondamentale che i campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedure coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, contro colorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Campioni FFPE

Pretrattamento del campione

Pretrattare il campione (sparaffinatura, proteolisi) conformemente alle istruzioni per l'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

Denaturazione e ibridazione

1. Pipettare 10 μ l di sonda su ciascun campione pretrattato.
2. Coprire i campioni con un vetrino coprioggetto (22 x 22) mm (evitare la formazione di bolle) e sigillare il coprioggetto.

Raccomandiamo di utilizzare una colla per vetrini (per esempio, Fixogum).

3. Porre i vetrini su piastra calda o su ibridizzatore e denaturare i campioni per 10 min. a 75°C.
4. Trasferire i vetrini in camera umida e ibridare overnight a 37°C (per esempio in una stufa da ibridazione).

È fondamentale che i campioni non si asciughino durante la fase di ibridazione.

Post-ibridazione

Procedere coi passaggi post-ibridazione (lavaggio, contro colorazione e microscopia fluorescente) come indicato nelle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit.

13. Interpretazione dei risultati

Con l'uso di filtri appropriati, i segnali di ibridazione della sonda appaiono verdi (distale alla regione di rottura di NTRK3) e arancioni (prossimale alla regione di rottura di NTRK3).

Situazione normale: nelle interfasi di cellule normali o cellule senza una traslocazione che coinvolge la regione del gene NTRK3, compaiono due segnali di fusione verdi/arancioni (vedere Fig. 2).

Situazione aberrante: Una regione del gene NTRK3 interessata da una traslocazione è evidenziata da due segnali separati, di cui uno verde e uno arancione. Segnali isolati arancioni sono il risultato di delezioni distali alla regione del punto di rottura di NTRK3 o sono dovuti a traslocazioni sbilanciate a carico di questa regione cromosomica (vedere Fig. 2).

I segnali sovrapposti possono apparire come segnali gialli.

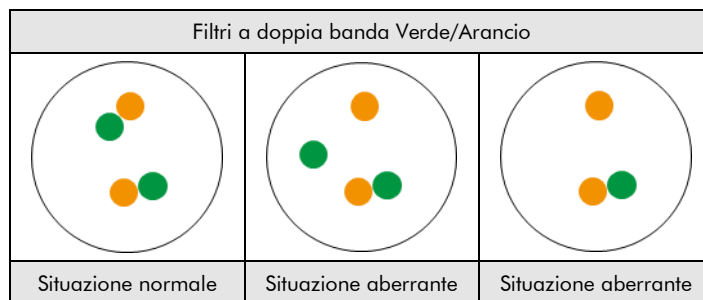


Fig. 2: Risultati attesi in situazione normale e aberrante

Le aberrazioni genomiche dovute a piccole delezioni, duplicazioni o inversioni potrebbero dare luogo a segnali scarsamente visibili.

Altri pattern di segnali possono essere osservati in campioni anormali che possono dare combinazioni di segnali differenti rispetto a quelli sopradescritti. Pattern di segnali inattesi dovrebbero essere studiati/approfonditi ulteriormente.

Note:

- A causa della cromatina decondensata, il singolo segnale FISH può apparire come un piccolo cluster. Due o tre segnali della stessa misura, separate da una distanza ≤ 1 del diametro di un segnale, dovrebbero essere contati come un singolo segnale.
- Non valutare i nuclei sovrapposti.
- Non contare nuclei over-digeriti (identificabili da una regione scura all'interno del nucleo).
- Non contare i nuclei con una forte auto fluorescenza, che impedisce l'identificazione dei segnali.
- Un risultato negativo o inatteso può essere causato da fattori multipli (vedi capitolo 17).
- Al fine di una corretta interpretazione dei risultati, l'utilizzatore deve validare questo prodotto prima del suo utilizzo in procedure diagnostiche secondo le linee guida nazionali e internazionali.

14. Procedure di Controllo qualità raccomandate

Al fine di monitorare la corretta performance del campione processato e testare i reagenti, ogni test dovrebbe essere associato a controlli interni e esterni. Se i controlli interni e/o esterni non forniscono colorazioni appropriate, i risultati con i campioni dei pazienti devono essere considerati non validi.

Controllo interno: Cellule non neoplastiche all'interno di un campione che mostra un pattern normale di segnali, ad esempio, i fibroblasti.

Controllo esterno: Campioni di controlli positivi e negativi validati.

15. Caratteristiche di performance

Campioni citologici

Le performance sono state valutate in conformità alle istruzioni d'uso del kit ZytoLight FISH-Cytology Implementation Kit.

Accuratezza: La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stato valutato in metafasi di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati la sonda si è ibridata unicamente con i loci previsti. Non sono stati osservati ulteriori segnali o ibridazioni incrociate. Pertanto, l'accuratezza è pari al 100%.

Sensibilità analitica: Per l'analisi della sensibilità analitica, la sonda è stata valutata su metafasi di cellule normali di maschio con cariotipo normale. Tutti i nuclei hanno mostrato il normale pattern di segnali previsto in tutti i campioni testati. Pertanto, la sensibilità analitica è pari al 100%.

Specificità analitica: Per l'analisi della specificità analitica, la sonda è stata valutata in metafasi di cellule di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati, tutti i segnali si sono ibridati esclusivamente con i loci target e con nessun altro locus. Pertanto, la specificità analitica è pari al 100%.

Campioni FFPE

Le performance sono state valutate in conformità alle istruzioni d'uso del kit *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit*.

Accuratezza: La localizzazione del segnale di ibridazione della sonda è stato valutato in metafasi di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati la sonda si è ibridata unicamente con i loci previsti. Non sono stati osservati ulteriori segnali o ibridazioni incrociate. Pertanto, l'accuratezza è pari al 100%.

Sensibilità analitica: Per l'analisi della sensibilità analitica, la sonda è stata valutata su metafasi di cellule normali di maschio con cariotipo normale. Tutti i nuclei hanno mostrato il normale pattern di segnali previsto in tutti i campioni testati. Pertanto, la sensibilità analitica è pari al 100%.

Specificità analitica: Per l'analisi della specificità analitica, la sonda è stata valutata in metafasi di cellule di maschio con cariotipo normale. In tutti i campioni testati, tutti i segnali si sono ibridati esclusivamente con i loci target e con nessun altro locus. Pertanto, la specificità analitica è pari al 100%.

16. Smaltimento

Lo smaltimento dei reagenti deve avvenire in accordo alle regolamentazioni locali.

17. Risoluzione dei problemi

Qualsiasi modifica dalle istruzioni operative può comportare risultati di colorazione inferiori o a nessuna colorazione. Alcuni dei punti di questa sezione sono applicabili solo utilizzando il kit *ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit*.

Segnali deboli o mancanti

Possibile causa	Azione
Sequenza target non disponibile	Utilizzare controlli appropriati
Campioni cellulari o tissutali non correttamente fissati	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" del manuale d'uso del kit <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Temperatura di pretrattamento, proteolisi, denaturazione, ibridazione o di lavaggio di stringenza non corretta	Controllare la temperatura di tutti i dispositivi utilizzati, utilizzando un termometro calibrato
Trattamento proteolitico non condotto in modo adeguato	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo, se necessario
Evaporazione della sonda	Se si utilizza l'ibridatore, è obbligatorio l'utilizzo di strisce umide o di taniche preriempite d'acqua. Se si utilizza una stufa d'ibridazione, usare una camera umida. Inoltre il coprioggetto deve essere completamente sigillato, per esempio con Fixogum, per prevenire che il campione si asciughi durante l'ibridazione
Concentrazione troppo bassa di tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza
Soluzione disidratante vecchia	Preparare una soluzione disidratante fresca
Microscopio a fluorescenza impostato in modo non corretto	Regolare il microscopio

Utilizzo di set di fluorescenza non corretto	Utilizzare un set di filtri appropriato per i fluorocromi della sonda. <i>Il filtro triplo fornisce meno luce rispetto al filtro singolo o doppio. I segnali possono quindi apparire più tenui utilizzando il filtro triplo.</i>
Sonde o fluorofori danneggiati a causa della luce	Effettuare i passaggi di ibridazione e di lavaggio al buio

Segnali di cross ibridazione; rumori di fondo

Possibile causa	Azione
Sparaffinatura incompleta	Utilizzare soluzioni fresche; controllare la durata della sparaffinatura
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina
Volume di sonda per area troppo elevato	Ridurre il volume di sonda per area/campione, dispensare la sonda goccia a goccia per evitare che si concentri localmente
Vetrini raffreddati a temperature ambiente prima dell'ibridazione	Trasferire i vetrini rapidamente a 37°C
Concentrazione troppo elevata del tampone di stringenza	Controllare la concentrazione del tampone di stringenza
Temperatura di lavaggio post ibridazione troppo bassa	Controllare la temperatura; aumentarla, se necessario
Disidratazione dei campioni tra i diversi passaggi di incubazione	Prevenire la disidratazione sigillando i vetrini e incubandoli in un ambiente umido

Morfologia degradata

Possibile causa	Azione
Il campione cellulare o tissutale non è stato fissato correttamente	Ottimizzare il tempo di fissazione e il fissativo o aggiungere un passaggio di post-fissazione come descritto in "procedure" nel manuale d'uso del kit <i>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</i>
Pretrattamento proteolitico non condotto correttamente	Ottimizzare il tempo di incubazione in pepsina, aumentandolo o diminuendolo se necessario
Asciugatura insufficiente prima dell'applicazione della sonda	Aumentare i tempi di asciugatura

Nuclei sovrapposti

Possibile causa	Azione
Inadeguato spessore della sezione di tessuto	Preparare sezioni al microto dello spessore di 2-4 µm

Campione galleggiante sul vetrino

Possibile causa	Azione
Rivestimento inadatto del vetrino	Utilizzare vetrini idonei
Pretrattamento proteolitico troppo forte	Ridurre il tempo di incubazione in pepsina

Contro colorazione debole

Possibile causa	Azione
Bassa concentrazione di soluzione DAPI	Utilizzare <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (codice prodotto MT-0008-0.8)
Tempo di incubazione in DAPI troppo breve	Aggiustare il tempo di incubazione in DAPI

18. Letteratura

- Amatu A, et al. (2016) *ESMO Open* 1: e000023.
- Arce C, et al. (2005) *World J Surg Oncol* 3: 35.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Knezevich SR, et al. (1998) *Nat Genet* 18: 184-7.
- Leeman-Neill RJ, et al. (2014) *Cancer* 120: 799-807.
- Nagasubramanian R, et al. (2016) *Pediatr Blood Cancer* 63: 1468-70.
- Raez LE & Rolfo C (2016) *Lung Cancer Manag* 5: 1-4.
- Roberts KG, et al. (2014) *N Engl J Med* 371: 1005-15.
- Skálová A, et al. (2010) *Am J Surg Pathol* 34: 599-608.
- Tognon C, et al. (2002) *Cancer Cell* 2: 367-76.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.
- Wang L, et al. (2017) *J Mol Diagn* 19: 387-96.
- Wu G, et al. (2014) *Nat Genet* 46: 444-50.

I nostri esperti sono disponibili per rispondere alle vostre domande. Contattare per cortesia helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
 Fischkai 1
 27572 Bremerhaven/ Germania
 Tel.: +49 471 4832-300
 Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
 Email: info@zytovision.com

Marchi registrati:

ZytoVision® e ZytoLight® sono marchi registrati da ZytoVision GmbH.